

# Method for non-invasive 3D optical examination of skin and for the therapy of pathological changes ascertained treats melanomas with laser applications

Veröffentlichungsnummer DE10065146

Veröffentlichungsdatum: 2002-07-11

Erfinder KOENIG KARSTEN [DE]

Anmelder: KOENIG KARSTEN [DE]

Klassifikation:

- Internationale: A61B6/00; A61B5/00

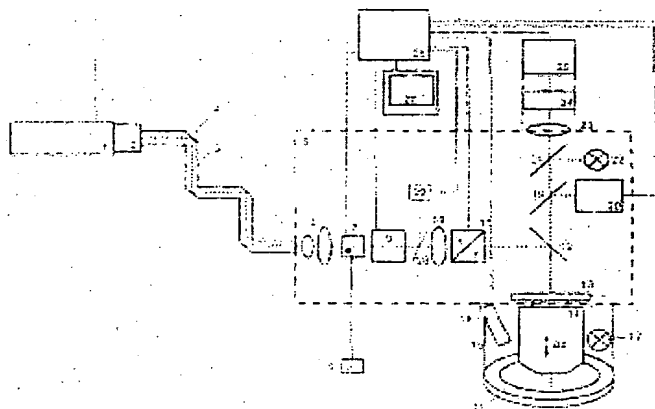
- Europäische: A61B5/103N4; A61N5/06C2;  
B23K26/03

Anmeldenummer: DE20001065146 20001222

Prioritätsnummer(n): DE20001065146 20001222

## Zusammenfassung von DE10065146

An 80MHz femto-second laser (1) has an adapter (2) adjustable in x/y directions with an 800 nm wavelength NIR beam that uses an optical articulated arm (3) with reflective elements to enable effective transmission of laser pulses without dispersing the pulses. On a first reflective element in the arm there is a removable cover (4) for making simple adjustments in the arm. On the end of the arm a hand piece (5) has a scanner (11) with a scanner lens (10) for pinpointing a beam on a desired area of tissue, for scanning a region of interest and for performing a single line scan. An Independent claim is also included for a system for non-invasive 3D optical examination of skin and for the therapy of pathological changes ascertained.



Daten sind von der **esp@cenet** Datenbank verfügbar - Worldwide



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 100 65 146 A 1

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
A 61 B 6/00  
A 61 B 5/00

21 Aktenzeichen: 100 65 146.1  
22 Anmeldetag: 22. 12. 2000  
43 Offenlegungstag: 11. 7. 2002

DE 100 65 146 A 1

71 Anmelder:  
König, Karsten, Dr., 07778 Neuengönna, DE

74 Vertreter:  
Pfeiffer, R., Dipl.-Phys. Fachphys. f. Schutzrechtsw.,  
Pat.-Anw., 07745 Jena

72 Erfinder:  
gleich Anmelder

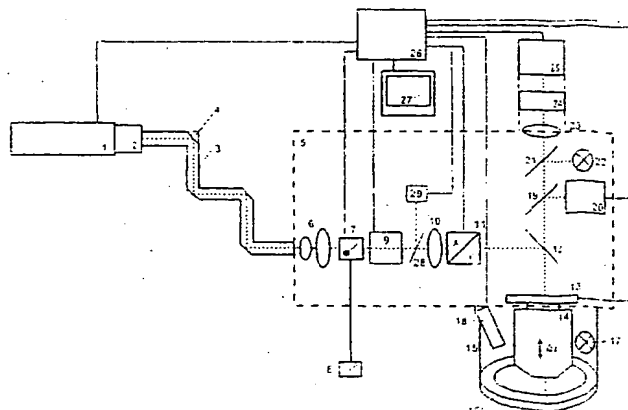
55 Entgegenhaltungen:  
DE 199 35 766 A1  
DE 197 19 344 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Anordnung zur nicht-invasiven dreidimensionalen optischen Untersuchung und Therapie der Haut

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Anordnung zur nicht-invasiven dreidimensionalen optischen Untersuchung und Therapie der Haut. Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung einer Laseranordnung und eines Verfahrens zur nicht-invasiven, dreidimensionalen optischen Untersuchung mit subzellulärer Auflösung zum Zweck der Diagnostik und Therapiekontrolle sowie zur nicht-invasiven hochpräzisen Bearbeitung von pathologischen Veränderungen der Haut und Hautanhangsgebilden, die für den Einsatz am Patienten geeignet ist. Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren und eine Anordnung gelöst, welche durch die Anwendung in der jeweiligen Tiefe der Haut fokussierter, gepulster Laserstrahlung im nahen Infrarotbereich mit Wellenlängen von 700 nm bis 1200 nm sowie mit Pulsbreiten von weniger als 20 Piko-senkunden gekennzeichnet sind, wobei die Lichtintensität der Pulse für die Untersuchung eine Größenordnung von Gigawatt pro Quadratzentimeter hat, um eine Multiphotonen Anregung körpereigener Fluorophore bzw. fluoreszierender Bestandteile der Fremdstoffe zu bewirken, während sie zur Bearbeitung eine Größenordnung von Terawatt pro Quadratzentimeter hat, um eine Materialabtragung infolge unmittelbar wirkender, destruktiver Multiphotonenprozesse zu erzielen. Die Erfindung ist vorzugsweise, aber nicht darauf beschränkt, zur Untersuchung und Therapie des Melanoms anwendbar.



DE 100 65 146 A 1

[0001] Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren und eine Anordnung zur nicht-invasiven optischen Untersuchung der Haut und von Hautanhangsgebilden, wie, z. B. Haare und Nägel, sowie zur Therapie dabei festgestellter pathologischer Veränderungen mittels Laserstrahlung.

[0002] Vorzugsweise dienen das Verfahren und die Anordnung zur in vivo Untersuchung von zellulären und subzellulären Strukturen und/oder zur Detektion von Fremdstoffen, wie Arzneimitteln oder kosmetischen Stoffen in der Haut und in Hautanhangsgebilden sowie zur Therapie von Melanomen durch selektive Bearbeitung melaninhaltiger Areale.

[0003] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und auf eine Anordnung zur nichtinvasiven dreidimensionalen optischen Darstellung von zellulären und subzellulären Strukturen sowie von Fremdstoffen in Haut und Hautanhangsgebilden sowie zur nichtinvasiven optischen Bearbeitung biologischer Strukturen mit hoher Präzision mittels Laserstrahlung.

[0004] Die optische Untersuchung von Haut und Hautanhangsgebilden zum Zweck der Diagnostik sowie die Untersuchung der Anreicherung und Pharmakokinetik von Arzneien und kosmetischen Stoffen im Gewebe erfolgt bislang üblicherweise durch eine zweidimensionale Darstellung mittels Visualisierung mit dem Auge oder Kamerasystemen.

[0005] Um eine gewissermaßen "dreidimensionale" Untersuchung tieferer Schichten zu ermöglichen, wird im allgemeinen durch einen Arzt eine Gewebeprobe invasiv mechanisch entnommen (Biopsie) und durch geeignete Schneidvorrichtungen in dünne Scheiben, sogenannte histologische Schnitte, zerlegt. Diese werden dann oftmals bestimmten Färbeprozeduren unterworfen. Die histologischen Schnitte werden anschließend mit dem Mikroskop in Transmission, Reflexion oder Fluoreszenz beobachtet. Aus diesen Beobachtungen, die üblicherweise durch einen erfahrenen Pathologen vorgenommen werden, kann auf Art und Ausdehnung krankhafter Veränderungen geschlossen werden. Diese Art der Diagnostik nimmt im allgemeinen Stunden und Tage in Anspruch.

[0006] Schnellere dreidimensionale Untersuchungen ohne Gewebeentnahme werden durch Ultraschall-Verfahren, die Verwendung ionisierender Strahlung oder starker Magnetfelder und auch durch optische Verfahren ermöglicht.

[0007] Optische 3D-Verfahren basieren auf der Absorption oder der Streuung in das Gewebe einfallender Strahlung. Die dreidimensionale nicht-invasive optische Untersuchung wird auch optische Tomographie oder optische Biopsie genannt. Ein derartiges optisches Verfahren mit räumlicher Auflösung für eine nichtinvasive 3D-Gewebediagnostik ist die Optische Kohärenztomographie (OCT) (z. B.: J. Am. Acad. Dermatol. 37(1997)958; Proc. SPIE 3567(1999)70). Dieses bildgebende Verfahren basiert auf der Interferenz zwischen einem schwachen, vom Objekt remittierten (rückgestreuten bzw. reflektierten) Signal und einem starken Referenzsignal. In der britischen Patentanmeldung Nr. 9725014.6 ist eine OCT-Apparatur mit durchstimmbarer Tiefenauflösung für die nichtinvasive optische Biopsie von Geweben beschrieben. Die Auflösung liegt in Abhängigkeit von der Bandbreite der verwendeten Lichtquelle typischerweise im Bereich von einigen zehn Mikrometern bis zu einigen Millimetern. Die Aufnahmezeiten liegen im Sekunden- und Minutenbereich. Nachteilig ist auch die Beschränkung der Information auf den Informationsgehalt des schwachen remittierten Signals.

[0008] Ein anderes nichtinvasives bildgebendes Verfahren basiert auf photoakustischen Effekten. Diese werden durch

lokale Absorption von optischer Strahlung (z. B. durch Blutgefäße) und damit verbundener geringer Temperaturerhöhung und Druckwellengeneration erzeugt. Die Druckwellen können an der Gewebeoberfläche nachgewiesen werden.

5 Akustische Detektoren geringer Abmessungen erlauben bei Einspeisung im nahen infraroten Bereich (NIR) Auflösungen im Bereich von einigen hundert Mikrometern bis zehn Millimeter (z. B. Opt. Lett. 23(1998)648, Appl. Phys. Lett. 75(1999)1058). Das Verfahren ist besonders geeignet, Durchblutungsphänomene zu studieren. Empfindliche Fluoreszenzmessungen, insbesondere zum Studium der stofflichen Zusammensetzung des Gewebes mit zugleich hoher räumlicher Auflösung, sind mit diesen Verfahren nicht möglich.

15 [0009] Bildgebende optische Verfahren zur Analyse von biologischen Geweben höherer räumlicher Auflösung im Bereich von einigen hundert Nanometern bis einigen Mikrometern beruhen bislang auf der konfokalen Detektion von Fluoreszenzstrahlung sowie von rückgestreuter Strahlung, sogenannter Remissionsstrahlung. Bei der konfokalen Detektion kommen räumliche Filter, sogenannte Lochblenden oder "Pinholes", zum Einsatz, die eine bevorzugte Detektion von Photonen aus der Fokusebene ermöglichen sollen. Typischerweise werden konfokale Laserscanning-Mikroskope eingesetzt. So wird in der Zeitschrift "Bioimaging" 25 4(1996)13 vom Einsatz von Laserscanning-Mikroskopen mit Laserwellenlängen von 365 nm und 488 nm berichtet, um Fluoreszenzen im Wellenlängenbereich über 515 nm in der normalen Haut zu detektieren. Dieses sogenannte Fluoreszenzimaging stellt eine sehr sensitive Methode dar, welche die Möglichkeit bietet, neben der Bilddarstellung von morphologischen Strukturen ("morphological imaging") auch eine funktionelle Bilddarstellung ("functional imaging") (z. B. Funktionalität der Atmungskette und des Redoxverhaltens durch Fluoreszenzimaging reduzierter Coenzyme) zu ermöglichen. Von großem Nachteil ist jedoch hierbei der Einsatz von kurzwelliger Fluoreszenz-Anregungsstrahlung, da diese aufgrund hoher Absorptions- und Streukoeffizienten nur über eine geringe Eindringtiefe in biologisches Gewebe verfügt.

40 [0010] Um Aussagen aus tieferen Schichten zu erhalten, werden vorteilhafterweise konfokale Mikroskope mit Laserstrahlung im roten oder nahen infraroten (NIR) Spektralbereich verwendet. Da die Absorption bei Verwendung von Strahlung geringer Intensität sehr gering ist und eine Fluoreszenz zelleigener Fluorophore nicht effektiv angeregt werden kann, wird lediglich die Remissionsstrahlung detektiert (J. Invest. Dermatol. 104 (1995)946; J. Invest. Dermatol. 113(1999)293; Urology 53(1999)853). Dabei sind schnelle Aufnahmen in Videobildfrequenz möglich (Appl. Opt. 38(1999)2105). Die Detektion der Remissionsstrahlung ermöglicht jedoch nur einen limitierten Informationsgewinn, der lediglich aus Brechzahlunterschieden innerhalb des Gewebes resultiert. Dennoch wurde beobachtet, daß Melanin infolge einer erhöhten Rückstreuung einen hohen Kontrast gegenüber der umliegenden Matrix verursacht und so detektiert werden kann (Journal of Investigative Dermatology 104:1996)946).

60 [0011] Ein genereller Nachteil der konfokalen Detektion von Gewebestandteilen ist zudem die geringe Photonenzahl, die pro Zeiteinheit durch den räumlichen Filter auf den Detektor gelangt. Zudem ist infolge Mehrfachstreuung eine genaue Zuordnung der detektierten Photonen zur Fokusebene nicht möglich.

65 [0012] Ein neueres Verfahren ist die sogenannte Multiphotonen-Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie, bei der durch Zwei- und Dreiphotonenanregung unter Verwendung von Laserstrahlung hoher Lichtintensität im geringen Po-

kusvolumen eines Mikroskopobjektivs mit Strahlung im Spektralbereich des Nahen Infrarot (NIR) sichtbare Fluoreszenzen räumlich aufgelöst detektiert werden können (Patent US 5.034.613). Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie wird bei der Multiphotonen-Mikroskopie ein sehr kleines Fluoreszenzanregungsvolumen genutzt. Die detektierten Fluoreszenzphotonen können diesem Volumen zugeordnet werden, womit die Notwendigkeit einer konfokalen Detektion entfällt. Neben der Messung der Fluoreszenzintensität, wurde über die Aufnahme zeitaufgelöster Zweiphotonenangeregter Fluoreszenzen an einzelnen isolierten Zellen auf einem Glasfenster berichtet (J. Microsc. 183(1996)197). Um die erforderlichen hohen Lichtintensitäten zu erreichen, werden typischerweise Femtosekundenpulse hoher Peakleistung, aber moderater, über die Zeit gemittelter mittlerer Leistung eingesetzt. Eine geeignete Laserquelle stellt der Titan-Saphir-Laser hoher Repetitionsrate dar. Üblicherweise werden die Fluorophore über einen nicht-resonanten Prozeß angeregt, bei dem im Fall einer Zweiphotonen-Anregung durch simultane Absorption von zwei Photonen die Fluoreszenz induziert wird und jedes Photon die Hälfte der notwendigen Anregungsenergie bereitstellt. Dagegen wurde in Untersuchungen an synthetischem Melanin beschrieben, daß das Pigment über einen resonanten Prozeß, einen Zweistufen-Prozeß, mittels NIR-Femtosekundenpulsen angeregt werden konnte. Zudem wurde ein Zweiphotonenangeregtes Autofluoreszenz-Spektrum einer extrahierten Hautprobe mittels Femtosekundenlaser und Spektrometer beschrieben, was möglicherweise auf einer Melanin-Fluoreszenz basieren könnte (Photochem. Photobiol. 73(1999)146). Jedoch emittieren auch andere zelleigene Fluorophore in diesem Bereich. Eine ortsaufgelöste Messung findet dabei nicht statt. Als Autofluoreszenz wird diejenige Fluoreszenz bezeichnet, die auf der Anregung körpereigener (endogener) Fluorophore basiert.

[0013] In den Publikationen Biophys. J. 72(1997)2405 und Ann. N. Y. Acad. Sci. 838(1998)58 wurde berichtet, daß mit Hilfe eines Multiphotonen-Laser-scanning-Mikroskops, basierend auf der Einkopplung eines mittels eines Argonionen-Laser gepumpten modensynchronisierten Titan-Saphir-Lasers in ein inverses Mikroskop "Axiovert 35" der Firma Zeiss, die Zweiphotonen-angeregte NADH-Fluoreszenz von Zellen in normaler Haut in vivo räumlich erfassbar ist. Pathologische Veränderungen der Haut wurden nicht untersucht. Die Anordnung, die auf der Verwendung eines Mikroskops basiert, ist für die in vivo Untersuchung von Patienten zum Zweck der Diagnostik pathologischer Veränderungen nicht geeignet. Eine Bearbeitung von biologischen Strukturen wurde mit dieser Anordnung nicht durchgeführt.

[0014] Die Laserbearbeitung von biologischen Strukturen erfolgt im allgemeinen bislang mit Systemen hoher oder mittlerer Laserleistung und mit kontinuierlich emittierenden (cw) Lasern oder gepulsten Systemen geringer Repetitionsrate und einer Pulsdauer von Nanosekunden oder länger. Typischerweise basiert die Gewebearbeitung auf thermischen Prozessen oder auf einem oberflächigen Abtragen mit einem Laser geringer Eindringtiefe, wie den CO<sub>2</sub>-Laser oder den im ultravioletten Bereich arbeitenden Excimerlaser. Obwohl durch die Wahl einer Laserwellenlänge und der Pulsdauer in Abhängigkeit vom Absorptionsvermögen und der Targetgröße eine selektive Zerstörung auch tiefliegender Targets, z. B. Blutgefäße und Melanosomen, erreicht werden kann, ist auch bei dieser sogenannten selektiven Thermolyse (Science 220(1983)524) eine hohe Präzision nicht gegeben. Zudem ist die Kombination mit einer 3D-Fluoreszenzdiagnostik zum Zweck der Lokalisation des Targets nicht bekannt.

[0015] Ein laserchirurgisches Verfahren hoher Präzision

zur Bearbeitung intrazellulärer Strukturen, insbesondere zur Dissektion von Chromosomen, mittels Ultrakurzpuls-Laser im NIR-Bereich ist dagegen in DE 19 19 345 A1 und in der Publikation Cell. Mol. Biol. 45(1999)195 beschrieben worden. Dieses Verfahren beinhaltet die Bearbeitung von biologischen Nanostrukturen innerhalb einer Zelle und erfaßt nicht den diagnostischen Bereich.

[0016] Eine Anordnung zur optischen Mikromanipulation, Analyse und Bearbeitung von Objekten mittels sichtbarer und NIR-Strahlung wurde in DE 197 19 344 A1 beschrieben. Sie zeichnet sich durch eine Umschaltung vom kontinuierlich emittierenden Laserbetrieb (cw-Modus) in den gepulsten Laserbetrieb aus und ist nicht für die Untersuchung und Bearbeitung pathologischer Veränderungen vorgesehen.

[0017] Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung einer Laseranordnung und eines Verfahrens zur nicht-invasiven, dreidimensionalen optischen Untersuchung mit subzellulärer Auflösung zum Zweck der Diagnostik und Therapiekontrolle sowie zur nichtinvasiven hochpräzisen Bearbeitung von pathologischen Veränderungen der Haut und Hautanhangsgebilden, die für den Einsatz am Patienten geeignet ist und welche auch die Untersuchung der Anreicherung und Pharmakokinetik von Arzneien und kosmetischen Substanzen in biologischen Geweben erlaubt und insbesondere die dreidimensionale Lokalisation von Melanomen und deren gezielte nicht-invasive Zerstörung ohne Beeinträchtigung benachbarter nicht-pigmentierter Gewebeareale ermöglicht.

[0018] Diese Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen beschriebene Erfindung gelöst.

[0019] Das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Anordnung sind geeignet, eine nichtinvasive dreidimensionale "optische Biopsie" hoher Auflösung zum Zweck der Diagnostik und der Therapiekontrolle zu erstellen sowie die Anreicherung und Pharmakokinetik von Arzneien und kosmetischen Substanzen im Gewebe zu untersuchen. Sie eignen sich auch für die Erkennung sowie die genaue Lokalisation und Ausdehnung von pathologischen Veränderungen von Haut und Hautanhangsgebilden, wie z. B. Melanomen, Psoriasis, Pigmentstörungen, Fremdkörpereinklungen, Wunderkrankungen, Akne, Pilz- und bakteriellen Erkrankungen. Zudem ermöglichen die Anordnung und das Verfahren eine nicht-invasive Gewebearbeitung hoher Präzision einschließlich der Inaktivierung einzelner multi-zellulärer Gewebereiche und einzelner Zellen. Die Bearbeitung kann auch im Inneren von Geweben ohne Beeinträchtigung umliegender Gewebepartien und ohne Zerstörung der Gewebeoberfläche erfolgen. Das Verfahren und die Anordnung sind insbesondere geeignet, Melanome geringer Ausdehnung zu erkennen und mit hoher räumlicher Auflösung zu lokalisieren sowie selektiv, unmittelbar und irreversibel zu schädigen.

[0020] Erfindungsgemäß wird zur nicht-invasiven optischen 3D-Diagnostik und Bearbeitung pathologischer Gewebeveränderungen fokussierte Strahlung im Spektralbereich von 700 nm bis 1200 nm, bestehend aus Femtosekunden-Pulsen oder Pikosekunden-Pulsen einer in Abhängigkeit von der Gewebetiefe, dem Pigmentierungsgrad und dem Bestrahlungsziel (Diagnostik oder Bearbeitung) geeignet veränderbaren Pulsleistung, eingesetzt, die bei Lichtintensitäten in der Größenordnung von Gigawatt pro Quadrat-zentimeter nichtresonante und resonante Multiphotonen-Fluoreszenzanregungen spezifischer endogener Fluorophore, insbesondere Melanin, hervorruft, die in Kombination mit einer Scanningeinheit und verstellbarer Fokusebene ein dreidimensionales Imaging von Gewebe ermöglichen, und anhand der räumlichen Anordnung der Autofluoreszenz-Intensität und der Autofluoreszenz-Lebensdauer eine

Unterscheidung von bestimmten pathologischen und gesunden Gewebe sowie der Wirkung von Pharmaka und kosmetischen Stoffen ermöglichen, eine Fluoreszenzanregung bestimmter Substanzen in den Pharmaka und kosmetischen Stoffen hervorrufen, sowie durch Pulsleistungserhöhung und einer Intensität in der Größenordnung von Terawatt pro Quadratzentimeter eine selektive unmittelbare Zerstörung einzelner Zellen und einzelner Gewebeareale ermöglicht, ohne umgebende Gewebeareale irreversibel zu schädigen.

[0021] Erfindungsgemäß kommt eine Anordnung zur Diagnostik und Bearbeitung zum Einsatz, die aus einem kompakten Femtosekunden-Laser oder Pikosekunden-Laser mit einer Laserwellenlänge im Bereich 700 nm bis 1200 nm, einem Strahlführungssystem in Form eines optischen Gelenkarmes mit reflektierenden Elementen, einem speziellen Handstück mit Scanner und fokussierender Optik der numerischen Apertur größer 0,4 und motorisch verstellbarer Fokusebene, einem in Abhängigkeit von der Gewebetiefe, dem Pigmentierungsgrad und dem Bestrahlungsziel (Diagnostik oder Bearbeitung) motorisch verstellbaren Strahlabschwächer, einem per Fußschalter bedienbaren Schaltelement, verschiedenen Detektoren und Optiken sowie einer Steuer-, Kontroll- und Auswerteeinheit besteht.

[0022] Überraschenderweise wurde in eigenen Forschungen gefunden, daß durch Multiphotonenanregung mittels 800 Nanometer-Femtosekunden-Laserimpulsen von endogenen (zelleigenen) Fluorophoren im normalen und pathologischen Gewebe deutliche Unterschiede auftreten, die für eine nichtinvasive Diagnostik hoher räumlicher Auflösung genutzt werden können. Insbesondere konnte bei der dreidimensionalen optischen Untersuchung von Melanomen, das Pigment Melanin durch von Multiphotonen angeregte Autofluoreszenz mit hoher Auflösung auch in der Gewebetiefe selektiv detektiert werden. Zudem war der Nachweis von Pharmaka und von kosmetischen Erzeugnissen in der Haut sowie deren Auswirkungen im Gewebe mit subzellulärer Auflösung möglich.

[0023] Interessanterweise wurde beobachtet, daß durch eine geeignete Erhöhung der Laserintensität bei gleicher Wellenlänge und Pulsdauer erreicht werden konnte, daß Zerstörungseffekte nur in den melaninhaltigen Gewebebereichen auftraten, nicht jedoch in den umgebenden nicht-pigmentierten Zellen. Durch eine geeignete Lichtintensitäts-Einstellung konnte in Kombination mit einer Scanning-Einrichtung, die ein Abrastern des Gewebes mit dem fokussierten Laserstrahl ermöglichte, an einem extrahierten Melanom demonstriert werden, daß eine selektive zelltoxische Wirkung im Gewebeerinneren erreicht werden konnte, wobei pigmentierte Zellen unmittelbar zerstört und nicht-pigmentierte Zellen ungeschädigt belassen wurden. Wurde die Laserintensität weiter erhöht, konnten auch nicht-pigmentierte Zellen unmittelbar irreversibel geschädigt und Zellmaterial abgetragen (ablatiert) werden. Wurde der Strahl nur auf eine Zelle innerhalb eines Gewebeverbandes gerichtet, konnte diese eine Zelle selektiv zerstört werden, ohne umliegende Zellen irreversibel zu schädigen.

[0024] Dem Destruktionsprozeß liegt ein sogenannter optischer Durchbruch und Plasmabildung zugrunde, bei dem durch Multiphotonen-Ionisation freie Elektronen und Biomolekül-Ionenrumpfe erzeugt werden. Dieser Prozeß kann für eine Materialablation genutzt werden. Da bei Verwendung von Fokussieroptik hoher numerischer Apertur nur in dem Zentralteil des Submikrometer-Beleuchtungspots ausreichende Laserintensitäten zur Verfügung stehen, kann die selektive hochpräzise Bearbeitung ohne Beeinträchtigung benachbarter Gewebeareale ermöglicht werden. Da offenbar die Schwelle für den optischen Durchbruch vom Pigmentierungsgrad abhängt, können melaninhaltige Zellen auch bei

einem gleichmäßigen Abrastern des Gewebes selektiv zerstört werden. So wird ein selektives, nichtinvasives "Knocking-out" von einzelnen Melanom-Zellen möglich.

[0025] Die Erfindung wird nachstehend an Ausführungsbeispielen näher erläutert. Von den beigefügten Abbildungen bzw. Zeichnungen illustrieren die Fig. 1 bis 6 das erfindungsgemäße Verfahren und dessen Wirksamkeit sowie die Fig. 7 und 8 zwei Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Anordnung:

[0026] Die Abb. 1A und 1B zeigen Autofluoreszenzaufnahmen von normaler Haut eines gesunden Probanden aus 15 µm (A) und 45 µm (B) Gewebetiefe mit Submikrometerauflösung.

[0027] Abb. 2 zeigt Autofluoreszenz-Aufnahmen der Haut eines Patienten mit einer Pilzerkrankung am Vorderarm.

[0028] Die Abb. 3A und 3B zeigen die Autofluoreszenz eines Melanoms in verschiedener Gewebetiefe.

[0029] Die Abb. 4A und 4B von Kryostatschnitten eines Melanoms in Transmission (A) und Autofluoreszenz (B) demonstrieren deutlich die dominante Melanin-Fluoreszenz in den pigmentierten Bereichen gegenüber der Autofluoreszenz pigmentfreier Gewebeareale.

[0030] Fig. 5 zeigt beispielhaft Fluoreszenzabklingkurven von melaninhaltigem Gewebe im Vergleich zu pigmentfreiem Gewebe.

[0031] Die Abb. 6A und 6B zeigen die irreversible Schädigung melaninhaltiger Gewebebereiche durch intensive Femtosekunden-Laserimpulse.

[0032] Fig. 7 zeigt eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Anordnung.

[0033] Fig. 8 zeigt eine Abwandlung der Ausführungsform von Fig. 7.

[0034] Die Abb. 1 und 2 verdeutlichen, daß eine Unterscheidung von gesundem Gewebe und pathologischem Gewebe anhand der räumlichen Verteilung der Autofluoreszenz-Intensität möglich ist. Die Autofluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich wurde durch Einstrahlung von 170 Femtosekunden-Laserimpulsen der NIR-Wellenlänge von 800 nm, einer Pulsfolgefrequenz von 80 MHz und einer mittleren Leistung an der Hautoberfläche im Bereich von 1 mW bis 2 mW an der Oberfläche und bis zu 50 mW in der Gewebetiefe zunächst an Haut und Hautanhangsgebilden eines gesunden Probanden angeregt und mit einer Bildaufnahmezeit von 16 Sekunden bildgebend dreidimensional dargestellt. Die Strahlung wurde durch Fokussieroptik mit einem Arbeitsabstand größer 150 µm in verschiedene Schichten der Haut fokussiert und die Pulsleistung mit zunehmender Gewebetiefe erhöht. Wie aus der Fig. 1 ersichtlich ist, welche die Autofluoreszenz normaler Haut in einer Gewebetiefe von 15 µm (Abb. 1A) und 45 µm (Abb. 1B) darstellt, können mit subzellulärer Auflösung einzelne Zellen und fluoreszierende Zellbestandteile in verschiedenen Schichten der normalen Haut detektiert werden. Insbesondere wurde die Fluoreszenz der Koenzyme NAD(P)H und Flavine angeregt. Deutlich sind die einzelnen Zellen einschließlich der nicht-fluoreszierenden Zellkerne zu erkennen. Typische durch 800 nm angeregte Fluorophore sind die reduzierten Koenzyme NADH und NADPH, sowie Flavine, Kollagen, Elastin, Keratin, Lipofuszin, metallfreie und zinkhaltige Porphyrine. Während im Stratum corneum die Zellgrenzen eine deutliche Autofluoreszenz zeigen, fluoreszieren in darunterliegenden Schichten vorwiegend Zellorganellen, insbesondere Mitochondrien, sowie Bindegewebsbestandteile.

[0035] Pathologische Veränderungen führen zu deutlich verschiedenen Autofluoreszenzaufnahmen, wie die Abb. 2 anhand eines Patienten mit einer Pilzerkrankung am Unter-

arm, demonstriert. Neben den bekannten morphologischen Änderungen des Stratum corneum konnten überraschenderweise in diesem Krankheitsfall eine auffällige Autofluoreszenz im Zentraltteil der Zellen beobachtet werden, die eine deutliche Abgrenzung von umgebendem Normalgewebe ermöglichte.

[0036] Nicht nur morphologische Änderungen von Gewebestrukturen und eine unterschiedliche Biosynthese von endogenen Fluorophoren können für die verschiedenen Autofluoreszenzen von bestimmten pathologischen Geweben und gesundem Gewebe verantwortlich sein, sondern auch Unterschiede im Stoffwechselzustand und im intrazellulären Redoxverhalten. Diese können zum Beispiel durch Detektion der am Atmungsstoffwechsel wesentlich beteiligten Koenzyme NADH und NADPH erfaßt werden, die nur im reduzierten, nicht aber im oxidierten Zustand (NAD, NADP) fluoreszieren und deren Detektion ein "functional imaging" ermöglichen.

[0037] Die intensive NIR-Fluoreszenzanregungsstrahlung im Femtosekundenbereich kann zudem für die Untersuchung von Haarwurzeln, Pilzbefall von Nägeln, die Detektion von porphyrinproduzierenden Bakterien – wie z. B. *Propionibacterium acnes* – sowie von anormaler Akkumulation von Keratin, Kollagen und Elastin genutzt werden.

[0038] Intrazelluläres Melanin konnte bei Verwendung einer Wellenlänge von 800 nm mit deutlich geringeren Pulsleistungen zur Fluoreszenz angeregt werden als andere endogene Fluorophore, wie NADH und Flavine. Durch eine geeignete Einstellung der Pulsleistung, konnte eine nahezu selektive Darstellung des Melanins im pigmentierten Gewebe ermöglicht werden. Mittels 3D-Imaging der Fluoreszenzintensität konnte der pigmentierte Bereich von dem nicht-pigmentierten Gewebearcual mit subzellulärer Auflösung deutlich abgegrenzt werden. Die Abb. 3A und 3B zeigen fluoreszierende Melanin-Cluster in verschiedenen Gewebetiefen eines Melanoms (SSM = superficial spreading melanom), die durch Anregung mit 170 Femtosekunden-Laserpulsen einer mittleren Wellenlänge von 800 nm erstellt wurden.

[0039] Die Abb. 4, welche Kryoschnitte dieses extrahierten Melanoms in Transmission (A) und Fluoreszenz (B) zeigt, belegt, daß die nichtlinear angeregte Fluoreszenz bevorzugt aus den melaninhaltigen Gewebsbereichen stammt und sich deutlich von der umgebenden Autofluoreszenz pigmentfreier Zellen unterscheidet.

[0040] Eine andere Form der Unterscheidung von pathologischem und gesundem Gewebe ist durch die 3D-Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer gegeben. Die Fluoreszenzlebensdauer beschreibt die mittlere Zeit, die das Molekül nach Lichtabsorption im elektronisch angeregten Zustand verweilt. Da eine Vielzahl von Molekülen angeregt wird, beschreibt der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Absorption des Laserpulses ein molekültypisches statistisches Abklingverhalten, aus dem die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden kann. Mit Hilfe der sogenannten zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC), bei dem die einzelnen Fluoreszenzphotonen in Abhängigkeit von der Zeit nach Auftreffen des Laserpulses mittels schnellem Detektor registriert werden, wurden Melanome im Vergleich zum Normalgewebe vermessen. Wie aus Fig. 5 ersichtlich, weist melaninhaltiges Gewebe interessanterweise ein deutlich unterschiedliches Abklingverhalten als nicht-pigmentiertes Gewebe auf. Durch die räumlich-aufgelöste Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven bzw. die räumlich-aufgelöste Darstellung der mittleren Lebensdauer können somit auch mit diesem Kontrastverfahren die melaninhaltigen-Bereiche deutlich von den pigmentfreien Arealen unterschieden werden.

[0041] Die Applikation von fluoreszierenden Pharmaka und kosmetischen Substanzen konnte ebenfalls mit hoher Auflösung im Gewebe nachgewiesen werden und ermöglichte die Erfassung des Diffusionsverhaltens und des intrazellulären Anlagerungsverhaltens. So wurde mittels 800 nm Femtosekundenpulse die 3D-Verteilung des topisch verabreichten DNA-Markers Hoechst 33342 und die Biosynthese des Fluorophors Protoporphyrin IX nach topischer Applikation von Aminolävulinsäure im Tumorgewebe einer Maus erfaßt. Aber auch nichtfluoreszierende Stoffe konnten indirekt, z. B. aufgrund ihrer Wirkung auf den Zellmetabolismus oder durch morphologische Zellen, anhand der 3D-Autofluoreszenz detektiert werden. So führt die Anfeuchtung der Haut zu einem Aufquellen von Volumenstrukturen im Stratum corneum. Die detektierbaren Autofluoreszenz-Veränderungen in den einzelnen Zellschichten weisen insbesondere auf vertikale Zellvergrößerungen im Stratum corneum hin. Diese Volumenänderungen konnten durch Autofluoreszenzaufnahmen zeitabhängig erfaßt werden.

[0042] Die Abb. 6 demonstriert das "Knocking out" einer einzelnen Tumorzelle innerhalb eines Gewebeverbandes mittels intensiver Femtosekundenpulse im Bereich um  $3 \text{ TW/cm}^2$ – $4 \text{ TW/cm}^2$ . Zunächst wurde bei einer geringeren Intensität durch Zweiphotonenanregung nichtinvasiv die Melanin-Fluoreszenz dreidimensional in einzelnen Tumorzellen dargestellt, dann der Laserstrahl auf die zu zerstörende Targetzelle "geparkt" und durch Erhöhung der Leistung die melaninhaltigen Zellen innerhalb des Gewebeverbandes unmittelbar irreversibel zerstört. Die Zerstörung war anschließend durch multiphotonenangeregtes Fluoreszenz-imaging sichtbar. Umgebende Zellen zeigten kein verändertes Fluoreszenzverhalten oder morphologische Veränderungen.

[0043] Erfindungsgemäß wird eine Anordnung zur nicht-invasiven optischen in vivo 3D-Diagnostik und -Bearbeitung pathologischer Gewebeveränderungen eingesetzt, welche Strahlung in einem Spektralbereich von 700 nm bis 1200 nm und einer Pulsdauer im Femtosekunden- oder Pikosekunden-Bereich zur Anregung von Multiphotonen-Effekten nutzt, eine effiziente Übertragung der Laserstrahlung ohne den Nachteil der Pulsverbreiterung durch den Einsatz eines optischen Gelenkarmes mit reflektierender Optik ermöglicht, eine Schaltvorrichtung zur Erhöhung der Pulsleistung mit zunehmender Gewebetiefe sowie beim Wechsel vom Modus der Diagnostik in den Modus der Gewebearbeitung vorsieht, eine Fokussierungseinheit der numerischen Apertur größer 0,4 und motorisch verstellbarer Fokusebene sowie ein Strahlführungssystem aufweist, das sowohl eine gezielte punktuelle Bestrahlung als auch das Abrastern des zu untersuchenden und zu bearbeitenden Gewebearcuals ermöglicht, und Fluoreszenzdetektoren beinhaltet, die eine räumlich hochauflösende Darstellung der Fluoreszenzintensität und/oder der Fluoreszenzlebensdauer ermöglichen. Im Gegensatz zu der Verwendung von Lichtleitern und Linsensystemen, die bei Transmission ultrakurzer Pulse infolge optischer Dispersion zu signifikanten Pulsverbreiterungen führen können, ermöglicht der Einsatz von optischen Gelenkarmen mit reflektierenden Elementen eine effiziente Übertragung in alle Raumrichtungen ohne wesentliche Pulsverbreiterung.

[0044] Im folgenden wird eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Anordnung anhand der schematischen Fig. 7 näher erläutert.

[0045] Die erfindungsgemäße Anordnung besteht aus einem kompakten 80 MHz Femtosekundenlaser 1 mit einem in x- und y-Richtung verstellbaren Adapter 2, dessen NIR-Strahlung, bevorzugt Strahlung der Wellenlänge 800 nm, über einem optischen Gelenkarm 3 mit reflektierenden Ele-

menten eine effiziente Übertragung der Laserpulse ohne Pulsverbreiterung ermöglicht. Am ersten reflektierenden Element des Gelenkarmes befindet sich eine abnehmbare Kappe 4, die durch Visualisierung des durch das reflektierende Element transmittierten geringen Strahlanteils eine einfache Justage des Gelenkarmes ermöglicht.

[0046] Am Ende des Gelenkarmes 3 ist ein Handstück 5 montiert, welches einen Scanner 11 mit einer Scanneroptik 10 enthält, der wahlweise eine punktuelle Bestrahlung ("Punkten" des Strahls auf ein gewünschtes Gewebeareal), ein Abrastern einer Region of Interest (ROI) und das Abrastern entlang einer einzelnen Linie ("Line-Scan") ermöglicht. Weitere Bestandteile des Handstückes sind ein Strahlauflweiter 6, ein motorisch verstellbarer Strahlabschwächer 9, beispielsweise in Form eines drehbaren Polarisators, eine mittels Piezoelementes 13 motorisch entlang der optischen Achse verstellbare Fokussierungsoptik 14 mit einer numerischen Apertur größer 0,4, bevorzugt 1,3 sowie ein erster und ein zweiter Strahlteiler 12 bzw. 19. Diese Strahlteiler 12 bzw. 19 sind beispielsweise dichroitische Spiegel, welche jeweils NIR-Strahlung reflektieren und sichtbare Strahlung transmittieren lassen und somit eine Messung der Fluoreszenz durch Transmission durch beide Strahlteiler 12 bzw. 19 an einem Detektor 25 sowie eine Messung von geringen Anteilen der Remissionsstrahlung durch den Strahlteiler 12 transmittierten, jedoch am Strahlteiler 19 reflektierten Strahlung an einem Detektor 20 ermöglichen. Der Detektor 25 mit einer Spezialoptik 23 sowie einem Einschub 24 für Spektralfilter ist beispielsweise ein empfindlicher Photomultiplier zur Messung der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenz-Abklingkinetik in einem durch einen gegebenen Spektralfilter im Einschub 24 bestimmten Spektralbereich, während als Detektor 20 günstigerweise eine Photodiode Verwendung findet. Beide Detektoren 20 und 25 ermöglichen ebenfalls die Messung des während der Bearbeitung auftretenden Plasmaleuchtens. Zudem befindet sich ein mechanisch einschiebbarer Strahlteiler 21 sowie eine miniaturisierte Weißlichtquelle 22 einschließlich Optik im Handstück 5, um Abbildungen mittels Weißlicht zu ermöglichen. Weiterhin enthält das Handstück 5 eine Meßdiode 29 zur Erfassung der momentanen Laserleistung durch Messung eines an einer Glasplatte 28 reflektierten sehr geringen Anteiles derselben sowie zur Triggerung des Photomultipliers 25. Unmittelbar unterhalb der Fokussierungsoptik 14 befindet sich eine mechanische Vorrichtung 15 mit einem Ring 16 zur Aufnahme eines runden Spezialglas-Fensters, an welches das zu untersuchende Gewebeareal angedrückt wird. Das Spezialglas mit einer bevorzugten Dicke von 0,17 mm ist leicht auswechselbar und dient zudem als Optikschild. Das zu untersuchende bzw. zu therapierende Organ als Target ist vorteilhafter Weise mit einem speziellen Targethalter (z. B. einem Armlhalter) unterhalb der Vorrichtung 15 fixiert.

[0047] Die Kontrolle der Annäherung des Gewebeareals an den Ring 16 mit dem Fenster erfolgt mittels einer Miniatur-Beleuchtungsquelle 17 und einer Miniatur-CCD-Kamera 18.

[0048] Die Variation der Pulsleistung kann sowohl durch individuelle Ansteuerung des Abschwächers 9, insbesondere im Fall der Materialbearbeitung, bevorzugt jedoch durch automatische Steuerung in Abhängigkeit von der Position der Fokussierungsoptik 14 und der Signalthöhe des remittierten Signals am Detektor 20 für die tiefe aufgelöste 3D-Diagnostik, die Lokalisation sowie Bearbeitung des Targets erfolgen. Sowohl die Position der motorisch gesteuerten Fokussierungsoptik 14 als auch die Signalthöhe ermöglichen den Rückschluß auf die Fokusebene innerhalb des zu untersuchenden bzw. zu bearbeitenden Gewebeareals. Typi-

scherweise erfordert die Messung der Autofluoreszenz mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis in 100 µm Tiefe eine etwa 10 mal höhere Pulsleistung als an der Oberfläche.

[0049] Die Ansteuerung des Lasers 1, des Scanners 11, des Piezoelementes 13, des Filtereinschubes 24, der Detektoren 20 und 25 bzw. der CCD-Kamera 18 sowie die Signalerfassung erfolgt mittels PC 26 mit spezieller Hardware und Software, die im Fall der zeitaufgelösten Messung mittels der sogenannten zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) auch einen Time-Amplitude-Converter (TAC) enthält. Mittels geeigneter Software erfolgt die Signalverarbeitung. Diese kann prinzipiell auch einen automatischen Vergleich des gemessenen Bildes mit einer abgespeicherten Bibliothek, die Autofluoreszenz-Aufnahmen normaler und pathologisch veränderter Haut enthält, ermöglichen und so abnorme Zell- und Gewebsveränderungen automatisch lokalisieren. Die spezielle Software ermöglicht die Signal-speicherung und Signalauswertung, insbesondere die 3D-Bildauswertung, die Erstellung von Fluoreszenz-Abklingcharakteristiken und Fluoreszenz-Lebensdauer-Berechnungen. Zudem erstellt die Software 3D-Animationen. Auf einem Flachbildschirm 27 werden nach der Bildverarbeitung die Fluoreszenzsignale sowie das während der optischen Bearbeitung auftretende Plasmaleuchten sowie im Bedarfsfall die remittierten Strahlanteile dargestellt. Ein Fußschalter 8 gewährleistet durch Freigabe eines Verschlusses 7 den Laserbetrieb aus Sicherheitsgründen nur bei Bedienung desselben.

[0050] Fig. 8 zeigt eine Abwandlung der Anordnung nach Fig. 7, wobei unter Beibehaltung der jeweiligen Funktion eine Vielzahl der optischen und optisch-elektronischen Elemente, wie der Strahlauflweiter 6, der motorisch verstellbare Strahlabschwächer 9, der Scanner 11 mit der Scanneroptik 10, der optische Verschluß 7, die Glasplatte 28 sowie die Meßdiode 29 in den optischen Gelenkarm 3 integriert sind, während zweckmäßigerweise die Detektoren 20 und 25, die Strahlteiler 12, 19 und 21, die Spezialoptik 23, der Filtereinschub 24 sowie die Weißlichtquelle 22 im nunmehr mit 30 bezeichneten Handstück verbleiben.

#### Bezugszeichenliste

- 1 Kompaktlaser
- 2 Adapter mit x,y-Verstellung
- 3 optischer Gelenkarm mit reflektierenden Elementen
- 4 abnehmbare Kappe
- 5 Handstück
- 6 Strahlauflweiter
- 7 optischer Verschluß zur Freigabe der Laserstrahlung
- 8 Fußschalter
- 9 motorisch verstellbarer Strahlabschwächer
- 10 Scanneroptik
- 11 Scanner
- 12 erster Strahlteiler
- 13 Piezoelement
- 14 Fokussierungsoptik
- 15 mechanische Vorrichtung
- 16 Ring zur Aufnahme eines Spezialglas-Fensters
- 17 Miniatur-Beleuchtungsquelle
- 18 Miniatur-CCD-Kamera
- 19 zweiter Strahlteiler
- 20 Detektor zur Messung der Remission (Photodiode)
- 21 mechanisch einschiebbarer Strahlteiler
- 22 Weißlichtquelle
- 23 Spezialoptik
- 24 Einschub für Spektralfilter
- 25 Detektor zur Messung der Fluoreszenz und des Plasmaleuchtens (Photomultiplier)



- 26 PC mit spezieller Hardware und Software
- 27 Flachbildschirm
- 28 Glasplatte
- 29 Meßdiode
- 30 Handstück

# Patentansprüche

1. Verfahren zur nicht-invasiven dreidimensionalen optischen Untersuchung der Haut sowie zur Therapie dabei festgestellter pathologischer Veränderungen, vorzugsweise zur in vivo Untersuchung von zellulären und subzellulären Strukturen und/oder zur Detektion von Fremdstoffen, wie Arzneimitteln oder kosmetischen Stoffen, in der Haut und in Hautanhangsgebilden sowie zur Diagnose und Therapie von Melanomen durch selektive Bearbeitung melaninhaltiger Areale mittels Laserstrahlung, **gekennzeichnet durch** die Anwendung in der jeweiligen Tiefe der Haut fokussierter, gepulster Laserstrahlung im nahen Infrarotbereich mit Wellenlängen von 700 nm bis 1200 nm sowie mit Pulsbreiten von weniger als 20 Pikosekunden, wobei die Lichtintensität der Pulse für die Untersuchung eine Größenordnung von Gigawatt pro Quadratzentimeter hat, um eine Multiphotonen-Anregung körpereigener Fluorophore bzw. fluoreszierender Bestandteile der Fremdstoffe zu bewirken, während sie zur Bearbeitung eine Größenordnung von Terawatt pro Quadratzentimeter hat, um eine Materialabtragung infolge unmittelbarer wirkender, destruktiver Multiphotonenprozesse zu erzielen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zum Zweck der dreidimensionalen kontrastreichen Untersuchung die Pulsleistung mit der Fokussierung zunehmender Gewebetiefe erhöht wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Wahl der Laserwellenlänge und der Lichtintensität im Bereich von Gigawatt pro Quadratzentimeter bevorzugt melaninhaltige Gewebeareale durch Detektion der multiphotonenangeregten Melanin-Fluoreszenz dargestellt und für eine Melanom-Diagnostik verwendet werden.

4. Verfahren einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß durch eine geeignete Wahl der Lichtintensität, die höher als die unter Anspruch 3 zur Anwendung kommenden Lichtintensität ist und im Bereich von ein bis zwanzig Terawatt pro Quadratzentimeter liegt, ein durch die Untersuchung selektiertes Gewebeareal irreversibel geschädigt wird, ohne jedoch umgebende, nicht selektierte Gewebeareale irreversibel zu schädigen.

5. Anordnung zur nicht-invasiven dreidimensionalen optischen Untersuchung der Haut sowie zur Therapie dabei festgestellter pathologischer Veränderungen, vorzugsweise zur in vivo Untersuchung von zellulären und subzellulären Strukturen und/oder zur Detektion von Fremdstoffen, wie Arzneimitteln oder kosmetischen Stoffen, in der Haut und in Hautanhangsgebilden sowie zur Diagnose und Therapie von Melanomen durch selektive Bearbeitung melaninhaltiger Areale mittels Laserstrahlung, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen kompakten gepulsten Laser (1), einen optischen Gelenkarm (3) mit reflektierenden Elementen zur Übertragung der Laserpulse ohne merkliche Pulsverbreiterung zu einem auf der Haut zu führenden Handstück (5, 30), eine motorisch angesteuerte Optik (14) zur Fokussierung der Strahlung in verschiedenen Tiefen der Haut bzw. der Hautanhangsgebilde sowie eine Vorrichtung

(9) zur Einstellung der Lichtintensität in Abhängigkeit vom Untersuchungs- oder Therapie-Modus sowie von der Tiefe der Fokussierung aufweist.

6. Anordnung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung zur Einstellung der Lichtintensität ein motorisch gesteuerter Strahlabschwächer (9) ist.

7. Anordnung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Scanner (11) zum Abrastern des bestrahlten Bereiches in drei Dimensionen aufweist.

8. Anordnung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Scanner (11) für eine punktuelle Bestrahlung, ein Abrastern entlang einer Linie sowie ein flächenhaftes Abrastern eines Gewebeareals mittels fokussiertem Laserstrahl eingerichtet ist.

9. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin ein System von Detektoren (20, 25) und Filtern (24) aufweist, welches die Fluoreszenzintensität bzw. das Fluoreszenzabklingverhalten in einem wählbaren Spektralbereich räumlich, spektral und zeitlich aufgelöst zu detektieren vermag.

10. Anordnung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die motorisch fokussierte Optik (14) eine numerische Apertur größer 0,4 hat.

11. Anordnung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß ein Detektor (25) eingesetzt ist, welcher eine multiphotonenangeregte Fluoreszenzstrahlung erfaßt.

12. Anordnung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Detektor (25) zur zeitaufgelösten Erfassung des Fluoreszenz-Abklingverhaltens eine Zeitauflösung im Pikosekundenbereich aufweist.

13. Anordnung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektoren (20, 25) das während der Materialabtragung auftretende Plasma-leuchten zu erfassen vermögen.

14. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie einem mittels Fußschalter (8) bedienbaren optischen Verschluß (7) zur Freigabe der Laserstrahlung aufweist.

15. Anordnung nach einem der Ansprüche 5 bis 14, gekennzeichnet durch einen Rechner (26) zur Signal-speicherung und -auswertung.

16. Anordnung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Rechner (26) zur 3D-Bildauswertung sowie zur Erstellung von Fluoreszenz-Abklingcharakteristiken und von Fluoreszenz-Lebensdauer-Berechnungen eingerichtet ist.

17. Anordnung nach den vorstehenden Ansprüchen 5 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß unter Beibehaltung der jeweiligen Funktion eine Vielzahl der genannten optischen und optisch-elektronischen Elemente, wie der Strahlaufweiter (6), der motorisch verstellbare Strahlabschwächer (9), der Scanner (11) mit der Scanneroptik (10), der optische Verschluß (7), die Glasplatte (28) sowie die Meßdiode (29) in den optischen Gelenkarm (3) integriert sind, während sich zweckmäßigerweise die Detektoren (20) und (25), die Strahlteiler (12, 19 und 21), die Spezialoptik (23), der Filtereinschub (24) sowie die Weißlichtquelle (22) in einem Handstück (30) befinden.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

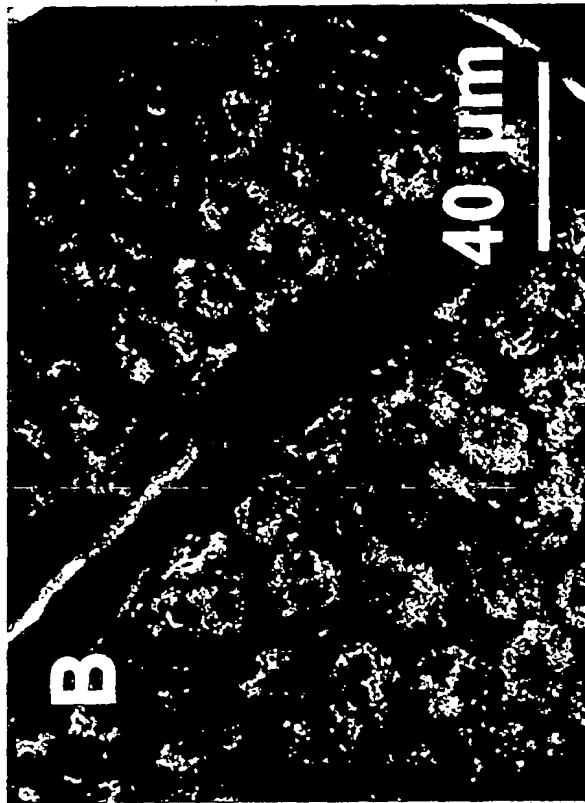


Abb. 1



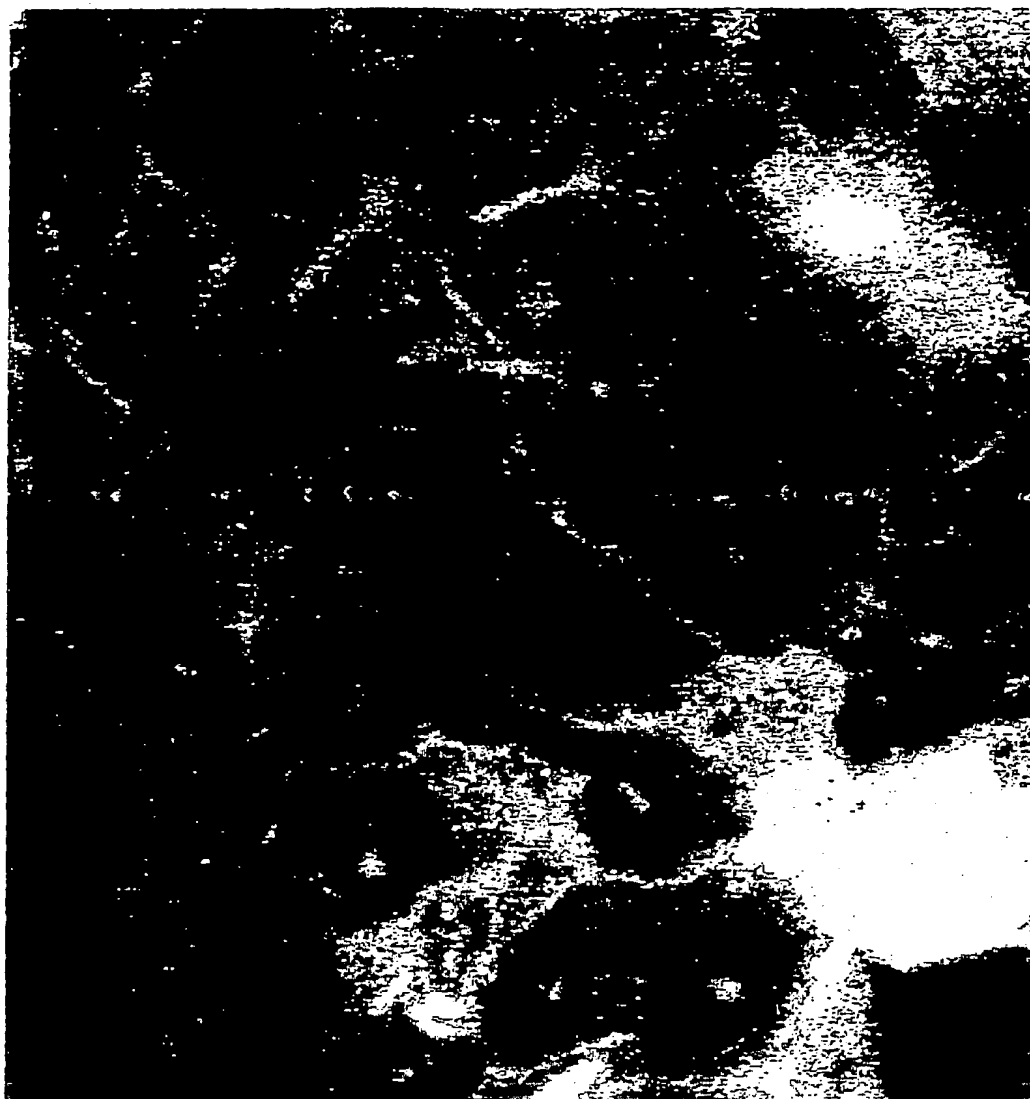
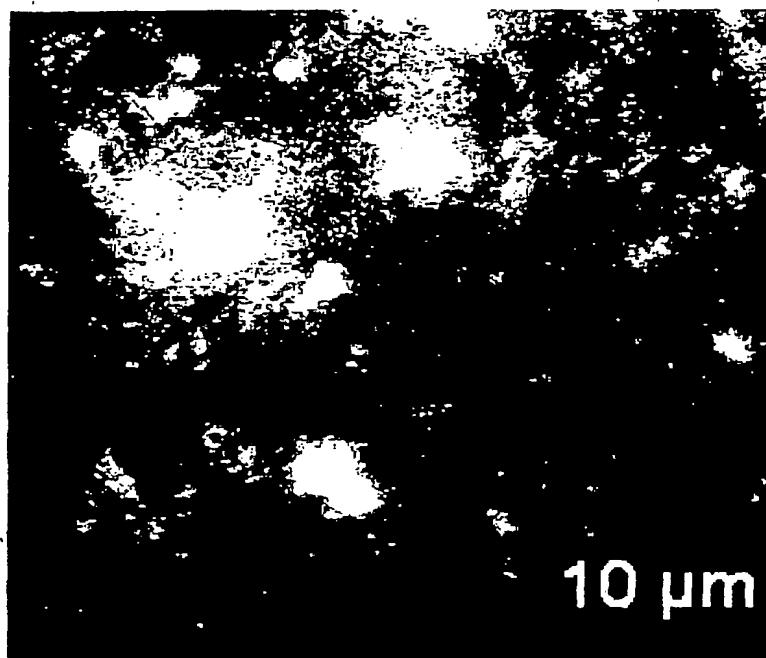
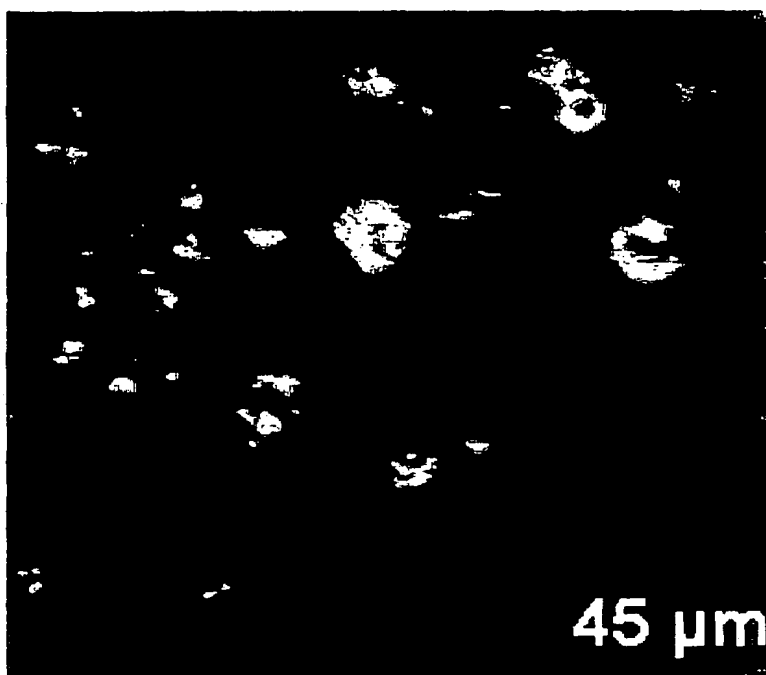


Abb. 2

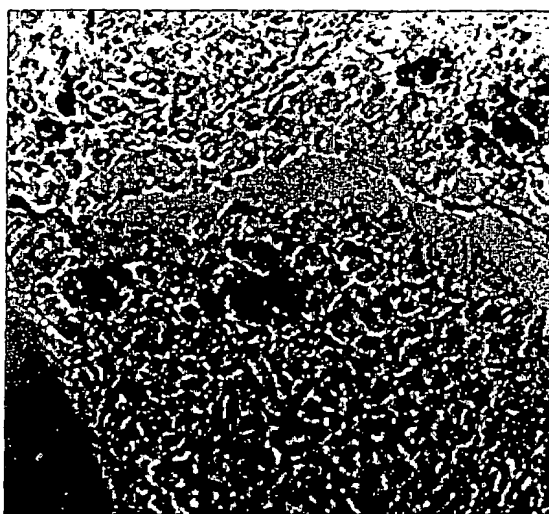


A

Abb. 3

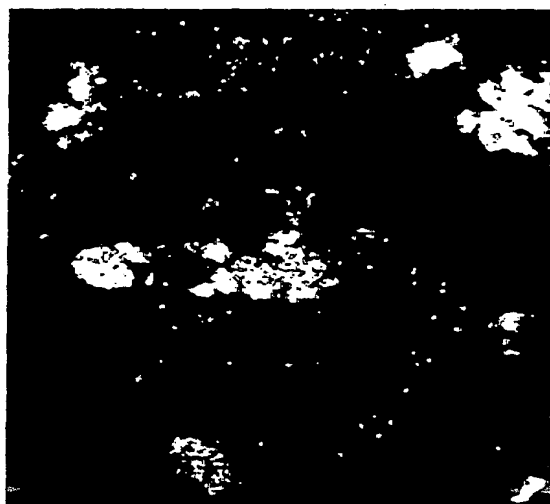


B



A

Abb. 4



B

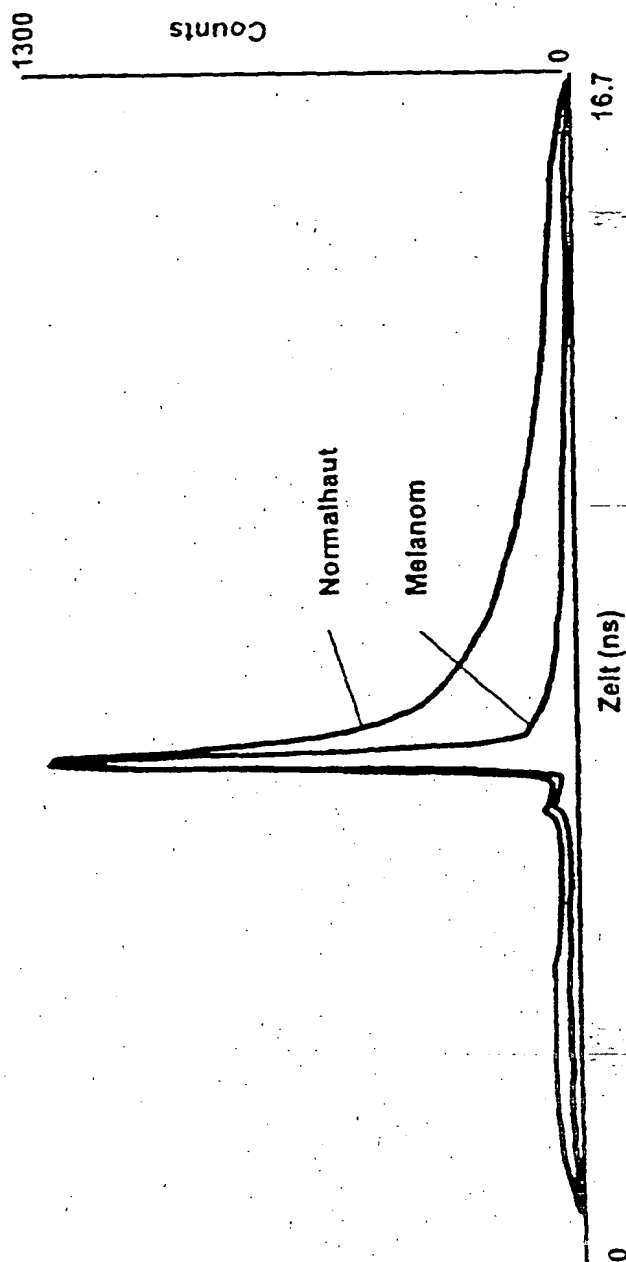


Fig. 5

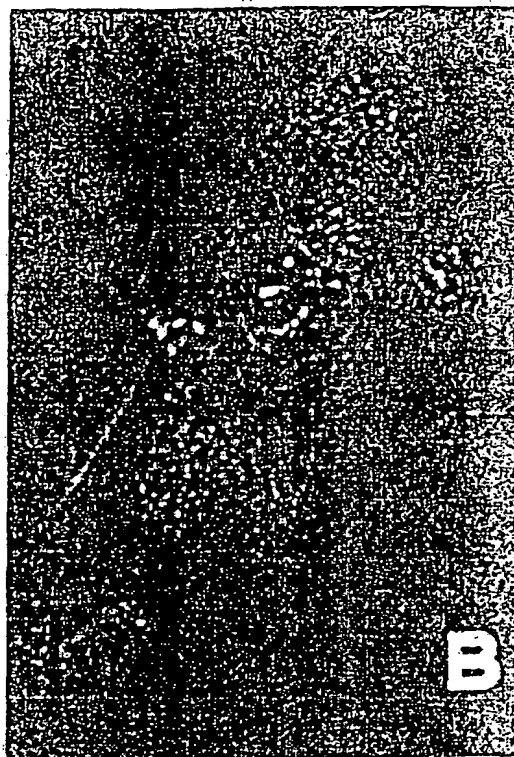
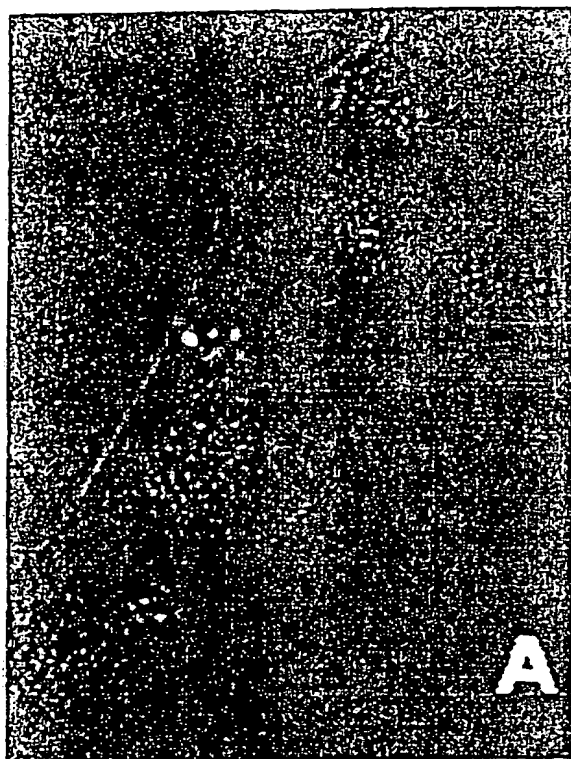
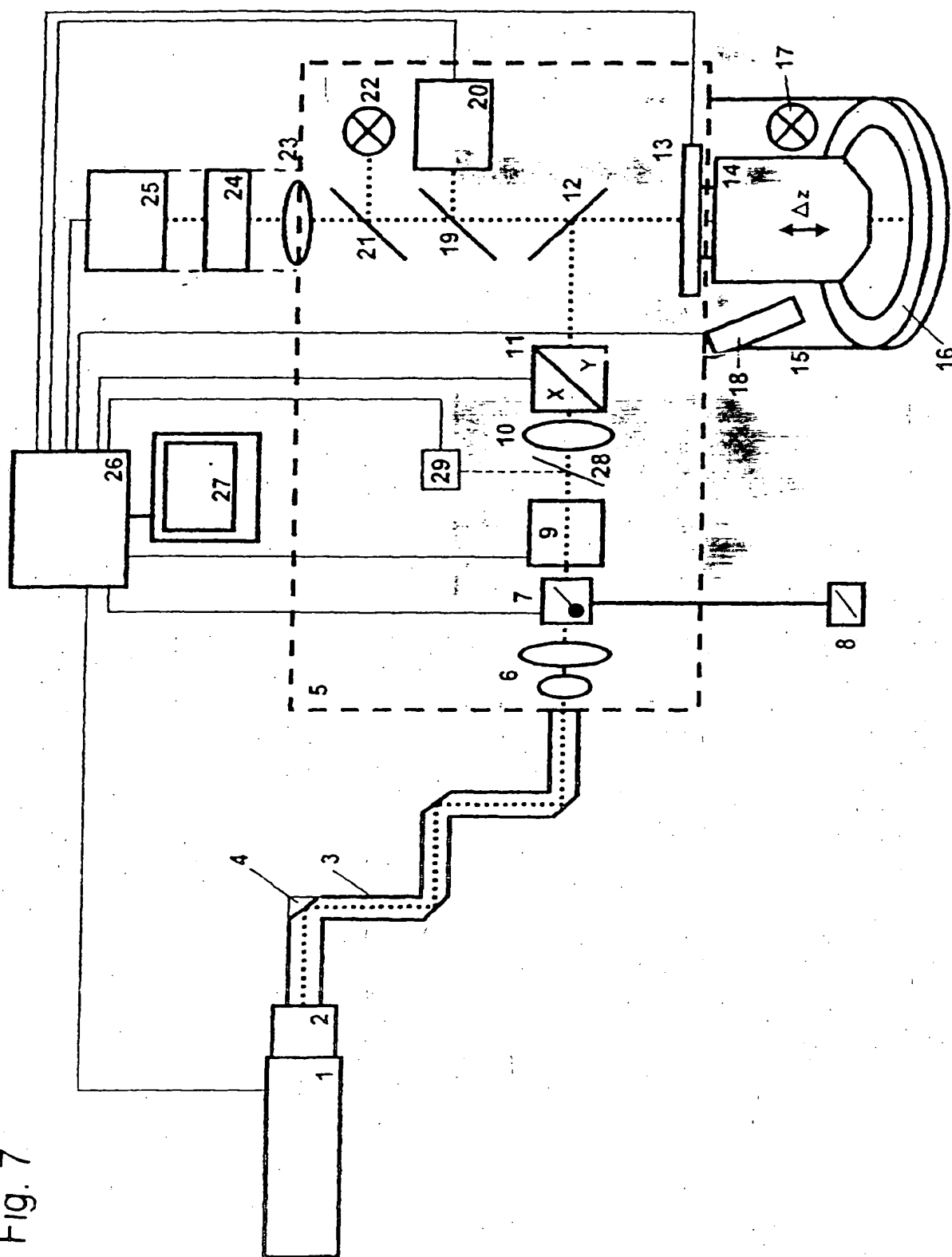


Abb. 6



Fig. 7



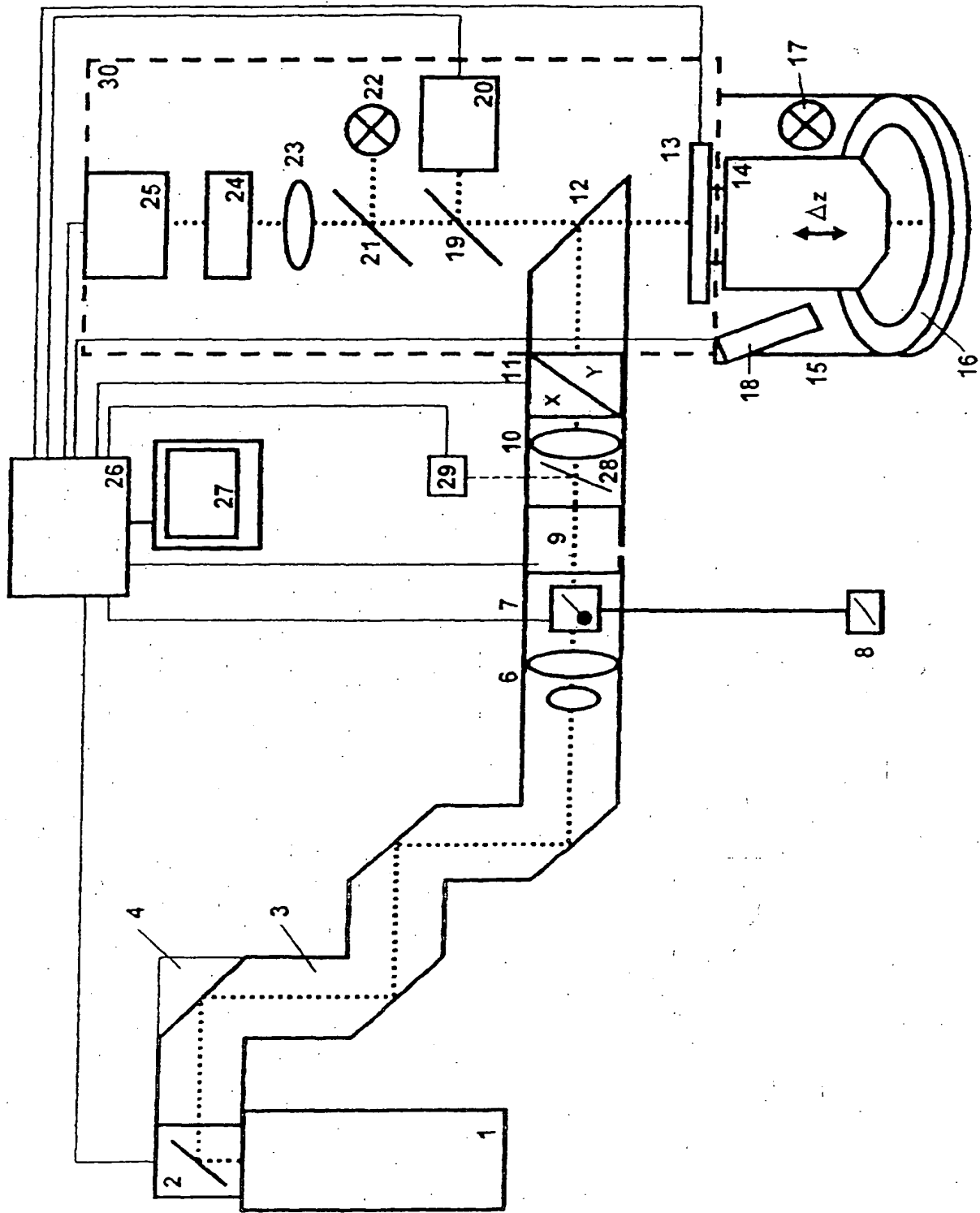


Fig. 8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**